

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-202298

(43)Date of publication of application : 15.08.1989

(51)Int.CI.

C12Q 1/68
G01N 33/58
// C12N 15/00

(21)Application number : 63-026028 (71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 05.02.1988 (72)Inventor : KAWASHIMA KAZUKO
NISHIMURA SUSUMU

(54) DIAGNOSIS OF CANCER AND KIT THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To diagnose whether the subject has carcinogenic constitution or not, by examining the presence of the fragment of 4kb forming a hybrid with 0.8kb DNA among fragments by digestion of the DNA of the subject with the restriction enzyme EcoRI.

CONSTITUTION: The DNA of a patient is digested with the restriction enzyme EcoRI to examine the presence of about 4kb fragment which forms hybrid with 0.8kb DNA corresponding to the protein kinase area in the epithelial cell-propagation factor receptor gene. When the fragment is present, the patient is diagnosed that it is high carcinogenic. Further, a diagnostic kit containing a probe which can detect the about 4kb fragment forming hybrid with 0.8kb fragment in digestion with EcoRI is prepared.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against

BEST AVAILABLE COPY

⑯ 公開特許公報 (A) 平1-202298

⑤Int.Cl.

C 12 Q 1/68
G 01 N 33/58
// C 12 N 15/00

識別記号

府内整理番号

A-6807-4B
A-7055-2G
A-8412-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

④公開 平成1年(1989)8月15日

⑤発明の名称 ガン診断方法および診断キット

⑥特 願 昭63-26028

⑦出 願 昭63(1988)2月5日

特許法第30条第1項適用 昭和62年8月7日 日本癌学会発行の「日本癌学会第46回総会記事」において文書をもつて発表

⑧発明者 河嶋 和子 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター宿舎A-23号

⑨発明者 西村 邦

⑩出願人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地

⑪代理人 弁理士 諸石 光熙 外1名

明細書

1. 発明の名称

ガン診断方法および診断キット

2. 特許請求の範囲

(1) 被検査人DNAの制限酵素EcoRIによる消化断片中、上皮細胞増殖因子受容体遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8kbのDNAとハイブリットを形成する約4kbの断片の存在を調べ、これが存在する場合、被検査人は癌発生の可能性が高い体质であると診断する方法

(2) 接検査人DNAの制限酵素EcoRIによる消化断片中、上皮細胞増殖因子受容体遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8kbのDNAとハイブリットを形成する約4kbの断片を検出することが出来るプローブを含むことを特徴とする癌診断キット

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、遺伝子分析による癌発生の予測、診断

方法に関する。更に詳細には、本発明は、被検査人染色体DNAの制限酵素EcoRIによる消化断片中、上皮細胞増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8kbのDNAとハイブリットを形成する約4kbの断片の存在を判定することにより被検査人は癌発生の可能性が高い体质であるか否かを診断する方法に関する。

<従来の技術>

少數の遺伝性癌ではある劣性遺伝子が関与していることが知られているが、人の癌の大部分を占める肺癌、胃癌、大腸癌等の通常の癌に関して、その発生が遺伝的に影響されているのか否は不明である。メラノーマや肺癌の発生率とc-Ha-ras遺伝子の制限酵素断片長多形(restriction fragment length polymorphism: RFLP)との相関関係が報告されている。また、代謝酸化に関する体质が肺癌発生の指標になると報告されているが、これらの結果については議論があり、最終的な結論には至っていない。更に、癌発生

率とこれらの現象との相関関係が顕著に高いとは言えない。

＜発明の背景＞

我々は、正常人および癌患者のDNAを分離し、制限酵素EcoRIで消化した断片について、EGFR遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8KbのDNAをプローブとして、サザンプロット解析を行った結果、正常人の白血球から分離したDNAでは、6.5Kb、5.0Kb、および3.5Kbの3つのバンドが検出され、約12%の頻度で、この3つのバンド以外に更に約4Kbのバンドが検出されるのに対して、癌患者の癌組織周辺の正常組織から分離したDNAでは、肺癌の場合、98% (51人中50人)、胃癌の場合、89% (18人中16人)、大腸癌の場合、100% (12人中12人)の高頻度で、この約4Kbのバンドが検出され、この約4KbのDNAの存在と癌発生に高い相関関係があることが判明した。更に、癌患者の白血球から分離したDNAについても調べた結果、同一患者では癌組織周辺の正常組織から分離したDNAと同一の結果を示した。

在するか否かを公知の方法で調べることにより容易に行うことができ、その具体的な手段は特に限定されるものではない。例えば、被検査人から分離したDNAを制限酵素EcoRIで消化後、例えば³²P-ラベルあるいは蛍光標識したEGFR遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8KbのDNAを用いサザン(Southern)らの方法によるプロッティングアッセイにより分析することができる。該約4KbのDNAを検出する場合、被検査人は癌は発生する可能性が高い体质であると判定する。

検査に使用するDNAは末梢血白血球、外科的にサンプリングした癌組織周辺の正常組織などから公知の方法により調整することができ、その入手方法に特に制限はない。

＜実施例＞

以下に本発明の具体例について更に詳細に説明する。

正常人および癌患者の末梢血白血球、外科的に摘出された被検査人のがん組織周辺の正常組織から

上記の結果から、被検査人のDNAのEcoRI断片中の該約4KbのDNAの存在を調べることにより被検査人は癌発生の可能性が高い体质であるか否かを診断することができる事が判明した。

＜発明の構成＞

従って、本発明は、被検査人白血球DNAの制限酵素EcoRIによる消化断片中、上皮細胞増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor; EGFR)遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8KbのDNA (Ullrich A.L. et al.: Nature, 309, 418-425(1984))とハイブリットを形成する約4Kbの断片の存在を判定することにより被検査人は癌発生の可能性が高い体质であるか否かを診断する方法に関する。更に、約4Kbの断片の存在を検出することができるプローブを用いることを特徴とする検査キットを提供するものである。本発明方法は、被検査人の白血球DNAのEcoRIによる消化断片中に、EGFR遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8KbのDNAとハイブリットを形成する約4Kbの断片が存

Perucho らの方法(Perucho, M. et al. Cell 27, 467-476, 1987)によりDNAサンプルを調整した。上記サンプルDNAを常法に従い制限酵素EcoRIにより消化した。次に、10 μgの消化DNAを0.8%アガロース・ゲル電気泳動に付した後、サザン(Southern)らの方法によりゲルからニトロセルロース膜にトランスファーした(Southern, E. J. Mol. Biol. 98, 503-517, 1975)。EGFR遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する0.8KbのDNAフラグメントの³²Pラベル化はアマシャム(Amersham)社のDNAラベリングシステムによった。

このニトロセルロースフィルターを80℃で4時間加熱の後、50%ホルムアミド、5×SSPE (1×SSPE: 0.15M NaCl, 10mM Na₂PO₄, 1mM EDTA pH7.4), 5×デンハート溶液(Denhardt's solution) (1×デンハート溶液: 0.02%フィコール(Ficoll)、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%牛血清アルブミン) および0.1mg/ml超音波処理サケ精子DNA溶液中で42℃で4時間インキュベートした。

ハイブリット形成反応は、50% ホルムアミド、5 × SSPE (1 × SSPE : 0.15M NaCl, 10mM Na₂PO₄, 1 mM EDTA pH7.4)、2 × デンハート溶液 (Denhardt's solution) (1 × デンハート溶液: 0.02% フィコール (Ficoll)、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% 牛血清アルブミン)、10% 硫酸デキストリン、0.1mg/ ml 超音波処理サケ精子DNA および 50~100ng の ³²P ラベル化した EGFR 遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する 0.8kb の DNA A フラグメント (比放射能、5 × 10⁵ cpm/ng) 中、42°C で 18 時間行った。ハイブリッド形成反応の後、フィルターを 65°C で 2 × SSC (1 × SSC: 0.3 M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム) 及び 0.1% SDS、続いて、1 × SSC、0.1% SDS、0.3 × SSC、0.1% SDS、0.1 × SSC および 0.1% SDS で洗浄した。次にフィルターを Kodak 社 XAR-5 フィルムに -80°C でさらしオートラジオグラフィーを作成した。

第 1 図は、正常人の末梢血白血球から分離した DNA を Eco RI 消化後、本発明の方法に従い行っ

たサンプルの代表的なパターンを示す。

年令 21 才から 57 才の 34 名 (男性 22 名、女性 12 名) の正常人について、検査した結果 30 名については、6.7kb, 5.0kb および 3.5kb の 3 本のバンドが検出されたが、4 名 (男 3 名、女 1 名) では、これらの 3 本のバンド以外に約 4kb のバンドが検出された。

第 2 図は、癌患者から分離した DNA を Eco RI 消化後、本発明の方法に従い行ったサンプルの代表的なパターンを示す。

検査の対象とした癌患者は、1986 年 8 月から 1987 年 8 月の間に、外科的手術を受けた癌患者の中から無作為に選択した。

癌患者の癌組織周辺の正常組織から分離した DNA では、肺癌の場合、98% (51 人中 50 人)、胃癌の場合、89% (18 人中 16 人)、大腸癌の場合、100% (12 人中 12 人) の高頻度で、該約 4kb のバンドが検出され、下記の表 1 に示した如く、この約 4kb の DNA の存在と癌発生に高い相関関係があることが判明した。更に、癌患者の白血球から分離し

た DNA についても調べた結果、同一患者では癌組織周辺の正常組織から分離した DNA と同一の結果を示した。なお、癌組織から分離した DNA では、該約 4kb の DNA が消失している例がかなり見られた。

表 1

被検査人	合計	4kb DNA 存在数 (%)
正常人	34 人	4 人 (12%)
<hr/>		
癌患者		
肺癌	51	50 (98%)
胃癌	18	16 (89%)
大腸癌	12	12 (100%)

<発明の効果>

本発明に従って、被検査人の DNA を Eco RI で消化した後、上皮細胞増殖因子受容体遺伝子のプロテインキナーゼ領域に相当する 0.8kb の DNA とハイブリットを形成する約 4kb の断片の存在を調べることにより、被検査人は癌が発生する可能性が高い体质であるか否かを診断することが可能と

なった。

4. 図面の簡単な説明

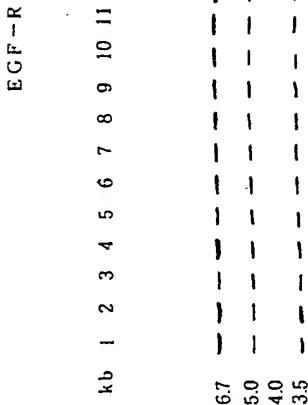
第 1 図は、正常人の末梢血白血球から分離した DNA を Eco RI 消化後、本発明の方法に従い行ったサンプルの代表的なパターンを示す。

第 2 図は、肺癌および胃癌患者の手術時に得られた癌組織周辺の正常組織から分離した DNA を Eco RI 消化後、本発明の方法に従い行ったサンプルの代表的なパターンを示す。

(完)

図面の添書(内容に変更なし)

第1図



手続補正書(方式)

昭和63年6月24日

特許庁長官 謹



1. 事件の表示

昭和63年 特許願 第026028号

2. 発明の名称

ガン診断方法および診断キット

3. 插正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市東区北浜5丁目15番地

(209)住友化学工業株式会社

代表者 森 英 雄

4. 代理人

大阪市東区北浜5丁目15番地

住友化学工業株式会社内

弁理士 (8597) 許 石 光

連絡先 TEL (06) 220-3404

5. 插正命令の日付

昭和63年5月31日(発送日)

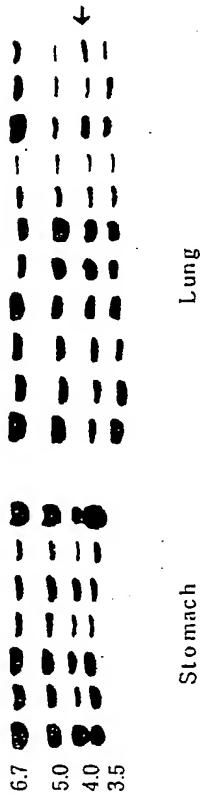
6. 插正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄及び図面

7. 插正の内容

- 1) 図面の簡単な説明の欄を別紙のとおりに插正する。
- 2) 第1図および第2図を別紙のとおりに插正する。

第2図



図面の簡単な説明

第1図は、正常人の末梢血白血球から分離したDNAをEco RI消化後、本発明の方法に従い行ったサザンプロットの代表的なパターンを示す図である。

第2図は、肺癌および胃癌患者の手術時に得られた癌組織周辺の正常組織から分離したDNAをEco RI消化後、本発明の方法に従い行ったサザンプロットの代表的なパターンを示す図である。

BEST AVAILABLE COPY